

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82115

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16210

研究課題名(和文) 難分解性化学物質を分解可能な新規塩分耐性型微生物の探索

研究課題名(英文) The study of salt resistant microorganisms capable of decomposing persistent toxic substances.

研究代表者

栗田 貴宣 (Awata, Takanori)

国土技術政策総合研究所・下水道研究部・研究官

研究者番号：80724905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では難分解性化学物質を塩分含有環境下で分解可能な微生物の取得および実環境中での分解ポテンシャルの把握を目的とした。好気および嫌気の両条件とも、分解は温度に大きく影響を受ける結果であった。また、物質によっては塩分濃度の増加によって分解活性が大きく低下することを確認した。残念ながら、塩分含有環境下での分解微生物の特定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, enrichment of salt resistant microorganisms capable of decomposing persistent toxic substances and investigation of the degradation potential for toxic substances under natural environmental condition was conducted. Temperature influenced on the degradation activity under both aerobic and anaerobic condition. Some of the toxic substances was not decomposed so much under salinity condition. Unfortunately, the enrichment and identification of salt resistant microorganisms was not attained.

研究分野：土木工学、環境微生物学

キーワード：難分解性化学物質 微生物分解 環境因子

## 1. 研究開始当初の背景

種々の化学物質を取り扱う工場の敷地内をはじめとし、様々な環境中において特定有害物質による汚染が明らかとなっている。このようなサイトは、油、重金属、さらにハロゲン系有機化合物でも汚染されているような複合的汚染例が多く、土壌汚染対策法が施行された後も判明件数は年々増加傾向にある(H25 環境省)。難分解性化学物質を対象に製造・使用を禁止するストックホルム条約では、1950-60年代に用いられた農薬や PCB 等の物質に加え、近年では界面活性剤にしばしば含まれるフッ素系有機化合物や難燃剤として用いられる臭素系有機化合物などの処理技術が急務となっている。また、殺菌剤として利用されたペンタクロロフェノール(PCP)や難燃剤として利用されたテトラプロモビスフェノール A(TBBPA)をはじめとする便利な化学物質は難分解性であることが多く、人体に対する健康被害も懸念されており、実環境汚染への対応が急務である。

土壌汚染に対する物理的な手法で汚染源の除去を行うことは可能であるが、低濃度汚染の場合にコストに対して効果が低く、土地の価値を上回ることも少なくないことから、安価で確実に汚染除去可能である技術が求められている。この問題を解決し得る技術として微生物による汚染除去技術(バイオレメディエーション)が注目されている。バイオレメディエーションの中でも、近年、日本での実施例が増加している、基質となる栄養剤を注入することで汚染サイトに存在する嫌気性脱ハロゲン化微生物の活性を増加させ、汚染物質の分解を促進させる(バイオスティミュレーション)手法が注目されている。しかしながら、汚染サイトの脱ハロゲン化微生物の存在量が少ない場合、汚染除去効率は大きく低下する。そのような場合は、有効な脱ハロゲン化微生物を選定し、汚染サイトに注入することで汚染除去を促進させる(バイオオーグメンテーション)手法が注目されている。バイオオーグメンテーションの実施では、注入微生物は単一またはそれらを混合したものである必要があり、さらにはその詳細な特徴や病原性の有無など様々な項目をクリアする必要があり、注入後の生態系回復なども考慮する必要があることから、実施例が少なく、知見も少ないのが現状である。

一般的に有機塩素化合物の脱ハロゲンを行う微生物は偏性嫌気微生物であり、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門、*-Proteobacteria* 門に属する微生物である。現在、脱ハロゲン化微生物のゲノム情報は多く公開されつつあるが、脱ハロゲン化に寄与する酵素遺伝子の機能同定は残念ながら進んでいない(Seshadri et al., 2005; Kube et al., 2005; Nonaka et al., 2006)。脱ハロゲン化微生物の遺伝子情報を含む多様な知見を蓄積することは、バイオレメディエーション技術の進歩に欠かせないものである。

バイオスティミュレーション、バイオオーグメンテーション共に現地試験によってその分解特性の調査は行われているが、適用できる環境は限られている。例えば海洋環境や汽水域など塩分含有環境に対しての知見はほとんど無いのが現状である。さらに海洋環境における油分解についての研究は行われているものの、難分解性有機物質を対象とした研究は少ない。難分解性化学物質を分解可能な塩分耐性型微生物を取得することはバイオレメディエーションの適用拡大に直接寄与することは言うまでもないが、既存ゲノムデータや生理学的特性などの比較により、生物多様性、生物進化、環境微生物学などの分野発展にも寄与することが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究は、塩分耐性かつ難分解性化学物質の除去に貢献できる微生物の集積培養、分離培養を目的とし、詳細な生理学的特性の把握を行うことを目的とした。微生物の培養と同時に、実環境中で難分解性化学物質が分解されるかどうかを明らかにするとともに、微生物分解に環境中のどの因子が大きく影響するかを明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプリング

愛知県内の1級河川において、河口(海水)、河口から 2km 地点(汽水)、河口から 15km 地点(淡水)の 3 箇所において季節ごとにサンプリングを行った。サンプルは底泥および水をポリ軟こう瓶に空気が入らないように入れ、冷蔵保存して実験室まで持ち帰った。サンプリング時の現地環境を把握するために、マルチ水質チェッカーを用いて温度、pH、酸化還元電位、電気伝導率、溶存酸素濃度、塩分濃度の測定を行った。

持ち帰った水サンプルはすぐに 0.2 $\mu$ m フィルターでろ過し、全炭素、無機炭素濃度の測定を行い、有機炭素濃度を算出した。また、陽イオンおよび陰イオン濃度の測定を行った。底泥サンプルは DNA 解析用に一部冷凍保存し、一部を乾燥させて CHN 分析用とした。

### (2) 好気および嫌気分解試験

好気および嫌気分解試験において、油のモデルとしてアントラセン、農薬のモデルとしてフェントロチオン、殺菌剤のモデルとしてペンタクロロフェノール、難燃剤のモデルとしてテトラプロモビスフェノール A を対象物質とした。好気分解試験では腰高ガラスシャーレ(90×60mm)に 30g の前培養した底泥とサンプリング水を 30mL 添加した。嫌気分解試験では 100mL のバイアル瓶に 30g の前培養した底泥とサンプリング水 30mL を添加した。滅菌風乾土 1g にアセトンに溶解させた対象物質を添加し、アセトンが蒸発するまで混合した。対象物質の最終濃度は

0.01mg/g-soil となるように添加した。嫌気分解試験は密栓後に窒素ガスで気相を置換した。これらを3反復で行った。また、対照系として、オートクレーブ滅菌(121、30分を1日おきに3回)した底泥とサンプリング水を用い、3反復で行った。分解試験温度はサンプリング時と同じ温度で行った。対象物質の抽出はアセトンヘキサンで行い、全量抽出によって測定を行った。測定にはGC/MSを用いた。

### (3)統計解析

好気分解試験および嫌気分解試験で得られた結果と現地測定および水質測定で得られたデータとの関連性を調べるためにSPSS version21を用いた統計解析を行った。解析は重回帰分析でステップワイズ法を用いた。ステップワイズ法の独立変数の投入基準は有意確率0.05以下で、除去基準は0.1以下とした。従属変数を分解試験で得られた分解率とし、独立変数として培養温度、pH、塩分濃度、全炭素、無機炭素、底泥中の炭素、水素および窒素量を用いた。統計解析を行う際には、独立変数の独立性を調べ、それぞれに共線性がないことを確認したパラメータを独立変数とした。

### (4)微生物群集構造解析

サンプリング時に冷凍保存しておいた底泥サンプルからDNA抽出を行った。DNAサンプルを用いてPCR増幅を行った。プライマーセットはV4領域を特異的な515F-806Rを用いた。PCR産物をアガロースゲル電気泳動を行い、目的のDNA断片が増幅されていることを確認した。電気泳動確認後に残りのPCR産物の精製を行った。次世代シーケンサーでの微生物群集構造解析に必要なタグを付加するためのセカンドPCRを行った後、解析を行った。得られたOTUテーブルを基に統計ソフトR version3.4.3を用いてNMDS(Non metric multidimensional scaling)による各サンプリング地点の微生物群集構造の類似性を確認した。また、各サンプリング地点の環境因子(水温、塩分、pH、全炭素、無機炭素)のデータをプロットし、どの要因が地点間における群集構造の違いに影響を及ぼしているかを視覚化した。

## 4. 研究成果

サンプリング地点の塩分濃度は河口において1~2.3%、河口から2km地点において0.04~0.7%、河口から15km地点において0%であった。また、河口に近づくにつれて炭素濃度が増加しており、様々な排水の影響が強くなることが示唆された。上記のことから同一河川において少なくとも3種類の地点でサンプリングができたことを確認した。

対象物質の抽出の際に回収率についての確認を行ったところ、アントラセン、フェニトロチオン、ペンタクロロフェノール、トリ

ブチルビスフェノールAの回収率はそれぞれ、89、92、89、65%であった。テトラプロモビスフェノールAの回収率が低かったが、対照系に対する分解率で評価するため測定可能であったとした。

好気分解試験の結果、フェニトロチオンは季節に関わらず上流へ行くほど分解率が高くなり、テトラプロモビスフェノールAは年間を通して高い分解率が確認された。一方で、アントラセンおよびペンタクロロフェノールの河口での分解率は低く、環境中へ放出された場合、河口付近に堆積する可能性が示唆された。嫌気試験分解試験の結果、フェニトロチオンは好気試験の結果と同様に、季節に関わらず、上流へ行くほど分解率が高くなる傾向が観察された。テトラプロモビスフェノールAは好気試験の結果とは異なり、季節によって分解率が異なり、さらに上流へ行くほど分解率が高くなる傾向が示唆された。一方で、アントラセン、ペンタクロロフェノールは嫌気条件ではほとんど分解が確認できず、底泥中での分解はほとんど起こらないと考えられる。環境因子と分解率の関係を統計解析によって解析を行ったところ、好気条件および嫌気条件において分解率と培養温度に高い相関が確認された。また、好気条件において、アントラセンの分解とpH、フェニトロチオンの分解と塩分および有機炭素量、ペンタクロロフェノールの分解と塩分濃度に相関があった。嫌気条件において、アントラセンの分解とpH、ペンタクロロフェノールの分解と全有機炭素量、テトラプロモビスフェノールAとpH、全有機炭素量、および底泥中の炭素量に相関が見られた。

微生物解析の結果を図1に示す。水環境ではグラム陰性菌が優占化することが多く、各サンプルにおいてもグラム陽性菌が占める割合は非常に小さい結果であった。Pseudomonas属はペンタクロロフェノールの分解(Kao et al., 2005)、Mycobacteriumはアントラセンの分解(Doddamani et al., 2000)が報告され、さらにフェニトロチオンの分解微生物がBartonella, Rhizobium, Burkholderia, Cupriavidus, Rseudomonasに分類された(Tago et al., 2005)と報告されている。上記の細菌群がサンプル中に含まれるかどうかを確認したところ、Bacillus属細菌は全てのサンプルに含まれ、

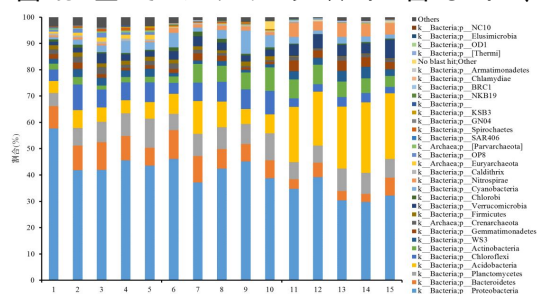


図1 門レベル微生物群集構造

Mycobacterium も 1 サンプルを除く全てのサンプルに含まれていることを確認した。また、Pseudomonas は PCP 分解率が比較的高かった 2015 年 10 月の汽水サンプルに比較的多く含まれており、何らかの関係があることが示唆された。しかしながら、サンプル中の全微生物量の把握が出来ておらず、リード数のみでの評価のため、今後は絶対量および相対量を考慮した再検討が必要である。

微生物群集構造と環境因子の関係性を明らかにするために NMSD 解析を行った(図 2)。図中の 1-5 は河口サンプル、6-10 は汽水域サンプル、11-15 は淡水サンプルを示す。様々な環境因子の中から塩分濃度、無機炭素濃度、pH が各サンプリング地点間の微生物群集構造の違いを説明する要因であることが確認できた。また、河口および汽水域サンプル中の微生物群集構造は比較的類似度が高く、流れ込む海水の影響があったと考えられる。一方で、場所ごとの微生物群集構造は季節によって大きく変化することなく、四季の水温変動の影響をあまりうけないことが示唆された。一方で、上述したように、分解活性と微生物量との関係が確認できておらず、微生物群集よりも微生物量が分解率に寄与するかどうかを明らかにする必要があり、今後の課題である。

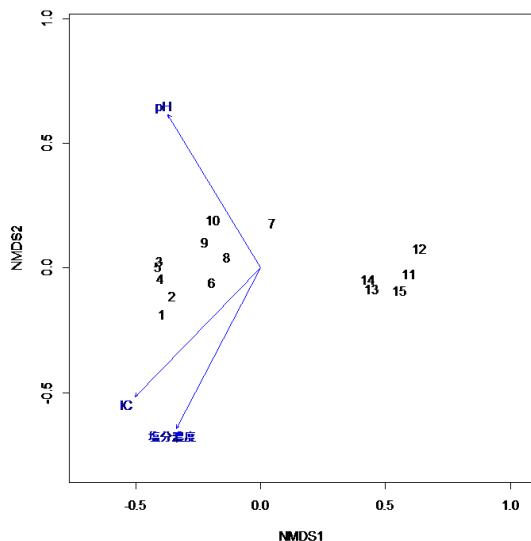


図 2 NMSD 解析結果

#### 参考文献

Doddamani HP and Ninnekar HZ, 2000. Biodegradation of phenanthrene by a Bacillus species, Current Microbiology 41: 11-14.

Kao CM, Liu JK, Chen YL, Chai CT, Chen SC., 2005. Factors affecting the biodegradation of PCP by Pseudomonas mendocina NSYSU, Journal of Hazardous

Materials 124: 68-73.

Kube M, Beck A, Zinder SH, Kuhl H, Reinhardt R, Adrian L., 2005. Genome sequence of the chlorinated compound respiring bacterium Dehalococcoides species strain CBDB1, Nature Biotechnology 23(10): 1269-1273.

Nonaka H, Keresztes G, Shinoda Y, Ikenaga Y, Abe M, Naito K, Inatomi K, Furukawa K, Inui M, Yukawa H., 2006. Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium Desulfitobacterium hafniense Y51 and comparison with Dehalococcoides ethenogenes 195, Journal of Bacteriology 188(6): 2262-2274.

Seshadri R, Adrian L, Fouts DE, Eisen JA, Phillipy AM, Methe BA, Ward NL, Nelson WC, Deboy RT, Khouri HM, Kolonay JF, Dodson RJ, Daugherty SC, Brinkac LM, Sullivan SA, Madupu R, Nelson KT, Kang KH, Impraim M, Tran K, Robinson JM, Forberger HA, Fraser CM, Zinder SH, Heidelberg JF, 2005. Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium Dehalococcoides ethenogenes, Science 307(5706): 105-108.

Tago K, Sekiya E, Katsuyama C, Hoshito Y, Tamada N, Hirano K, Sawada H, Hayatsu M., 2005. Diversity-degrading bacteria in soils from distant geographical areas, Microbes and Environments 21(1): 58-64.

環境省(H25)：土壤汚染対策法の施行状況及び土壤汚染調査・対策事例に関する調査結果

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Uchida K, Awata T, Katayama A. 2017. The biodegradation potential of organic pollutants under different salinity and seasons in a river. The 14th International Symposium on Persistent Toxic Substances 2017 (ISPTS2017), PS7-13, Nagoya, Japan.

2. 粟田貴宣、内田海、片山新太。同一河川の異なる地点における難分解性化学物質の分解特性把握。平成 29 年度土木学会中部支部研究発表会。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

粟田 貴宣 (AWATA, Takanori)  
国土交通省国土技術政策総合研究所・下水道研究部・研究官  
研究者番号：80724905

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )