

令和元年6月11日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16144

研究課題名(和文)海産ミミズと土着・随伴微生物群の協同的作用による沿岸底質浄化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Bioremediation of marine contaminated sediment by cooperation of marine oligochaete, *Thalassodrilides cf. briani* with indigenous microorganisms

研究代表者

伊藤 真奈 (Ito, Mana)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・研究員

研究者番号：60735900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質によって汚染された海洋底質の浄化に向け、海産ミミズと土着微生物の包括的な有害化学物質(多環芳香族炭化水素;PAHs)の分解に着目した。海産ミミズは土着微生物と相互補完的に底質中に含まれるPAHs濃度を減衰させた。また、その過程において土着微生物の菌叢が変化するとともに、底質および海産ミミズ体内において一部のPAHs分解菌の増加することが示唆された。以上、海産ミミズを用いた底質浄化の機構解明および浄化法の最適化に繋がる多くの知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、沿岸域に生息する底生動物(海産ミミズ)と微生物が相互補完的に底質中に含まれる汚染物質(多環芳香族炭化水素;PAHs)を減衰させること、また、その最適温度が20℃付近であることが明らかとなった。人為的活動が盛んな沿岸域の底質には、本研究で対象としたPAHsが幅広く存在しており、より効率的な浄化方法の構築が求められている。本研究の成果は、生物を用いた底質浄化法の構築にむけ重要な知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：We focused bioremediation of anthropogenic pollutant, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In this study, it is revealed that degradation of PAHs in marine sediment was stimulated by interaction between oligochaete, *Thalassodrilides cf. briani* and microorganisms. Application of *T. cf. briani* into sediment changed the microbial community structure in the sediment, and some genera known as PAH-degrading bacteria were increased in the sediment and the *T. cf. briani* body. Moreover, it is suggested that the optimum temperature for degradation of PAHs using the interaction of *T. cf. briani* and microorganisms is around 20℃.

研究分野：海洋環境

キーワード：多環芳香族炭化水素 バイオレメディエーション 底質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、水質汚濁防止法に基づく総量規制等により海洋沿岸域における水質環境は大きく改善された。一方で、沿岸域底質には依然として様々な有害化学物質が堆積しており、水質環境の二次汚染源となる可能性が危惧されていることから、その削減(安全かつ効率的な分解・浄化)が喫緊の課題とされている。

これまでに申請者は、顕著な有害化学物質分解能を有する海産ミミズを発見・単離し、新規バイオレメディエーション(生物学的環境修復)技術の担い手としての可能性を検討してきた。より高効率なバイオレメディエーション技術を構築するためには、その分解メカニズムの全容解明が非常に重要である。現時点では、海産ミミズ自身が分解酵素を分泌することによる直接的作用が示唆されているが、一部のジオキシゲナーゼ遺伝子の発現量が増加しないなど、それのみでは説明できない事項を多数確認している。一方、これまでダイオキシン類や PCB など数多くの有害化学物質の分解活性が明らかになっている分解微生物の関与が大いに考えられる。例えば、海産ミミズによる底質の攪拌、有機物分解、粘液分泌による微生物群集の活性化など、土着微生物および海産ミミズと随伴する微生物群との協同的作用による分解もきわめて重要であると推察される。しかしながら、海産ミミズに随伴する微生物の作用を含む包括的な有害化学物質の分解メカニズムはほとんど理解されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究課題では、海産ミミズによる有害化学物質の分解メカニズムを、土着・随伴微生物との相互補完的作用という観点から解明する。そこで、底質に含まれる汚染物質を海産ミミズと微生物が協同的に減衰させるかを検証する。また、浄化に伴った菌叢の変化を解析するとともに、分解に寄与すると考えられる分解菌を探索する。さらに、より高い分解活性が得られる至適条件(温度)を特定することで海産ミミズが有する汚染物質浄化能力を最大限に利用した新たな海洋沿岸域浄化技術の開発に向けた基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

海産ミミズ(*Thalassodrilides cf. briani*)は愛媛県沿岸域で採集後、研究室にて馴致し、試験に使用した。

底質に含まれる様々な物質の減衰を一斉分析した結果、海産ミミズ添加による多環芳香族炭化水素(PAHs)の顕著な減衰が確認された。また、PAHs は人為的活動による影響を受ける沿岸域に広く分布していることから、浄化の対象汚染物質として PAHs を選定とした。

(1) 海産ミミズと微生物による協同的な底質浄化の検証

汚染底質として、PAHs を高濃度で含有する天然海域の底質を用いた。汚染底質に海産ミミズを添加し、海産ミミズと土着微生物が混在する区(混合区)、底質のみ区(土着微生物区)および土着微生物を滅菌処理により排除した底質に海産ミミズを添加した区(海産ミミズ区)を設け、9週間の飼育試験を実施した(図1)。試験開始時および終了時、底質試料から PAHs を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)により27種の PAHs 濃度を測定した。また、底質および海産ミミズから DNA を抽出後、次世代シーケンサー(Miseq)を用いて細菌の16SrRNA 遺伝子の塩基配列を取得することで微生物群集構造を解析した。さらに、細菌の16SrRNA 遺伝子および PAHs 減衰に関与する機能遺伝子(bamA)量を real-time PCR により定量した。

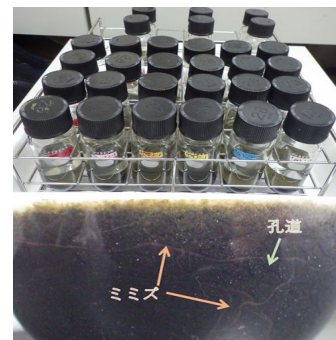


図1. 浄化試験および試験中の海産ミミズの様子

(2) 底質浄化の至適温度の特定

浄化の最適温度を明らかにするため、上記と同様、汚染底質に海産ミミズを添加し、15、20および25にて50日間の浄化試験を実施した。試験終了時、海産ミミズの生残および成長、底質中の微生物量、海水および底質に含まれる PAHs 濃度を測定した。

4. 研究成果

底泥中の PAHs の減衰率は、海産ミミズと土着微生物の混在下で最も高かった(表)。一方、土着微生物のみ処理区では、実験開始時に比べ有意な PAHs 濃度の変化は認められなかった。PAHs の環別に見ると3環の PAHs 濃度は、海産ミミズ区においても有意に減少したのに

表. 底質に含まれる27種 PAHs 合計濃度の減衰率(実験開始時を100%とする)

処理区	減衰率(%)			
	平均	標準偏差		
滅菌底質	0週	100.0	12.9	
	9週	無生物区	88.0	10.3
		海産ミミズ添加 海産ミミズ区	87.3	4.5
非滅菌底質	0週	100.0	28.4	
	9週	土着微生物区	88.0	15.2
		海産ミミズ添加 混合区	70.5	6.2

対し、より難分解性の4環の PAHs は、混合区でのみ有意な減少が認められた。以上のことから、海産ミミズによる底質浄化機構として、微生物との相互補完的作用が存在することが本研究

により明らかとなった。

微生物群集構造解析の結果、両処理区間で異なる菌叢を形成する傾向が認められ、海産ミミズを添加した底質では Alphaproteobacteria 網が増加する傾向が認められた(図 2)。また、海産ミミズ体内外に随伴する微生物群の多様性は底質の細菌群に比較して低く(図 3)、底質とは異なる独自の菌叢を形成していた。底泥中の細菌数および bamA の遺伝子数は、土着微生物区と混合区の間で有意な差は認められなかった。一方で、*Thalassospira* 属や *Rhodococcus* 属など、PAHs 分解菌が含まれる分類群が海産ミミズ添加区の底質や海産ミミズ体内で増加する傾向が確認されたことから、それら分解菌の寄与が示唆された。

以上、海産ミミズと微生物の関係は強固であり、海産ミミズの活動によって菌叢が変化し、それに伴って代謝が変化したことにより底質中に含まれる PAHs が効率よく減衰するが示唆された。

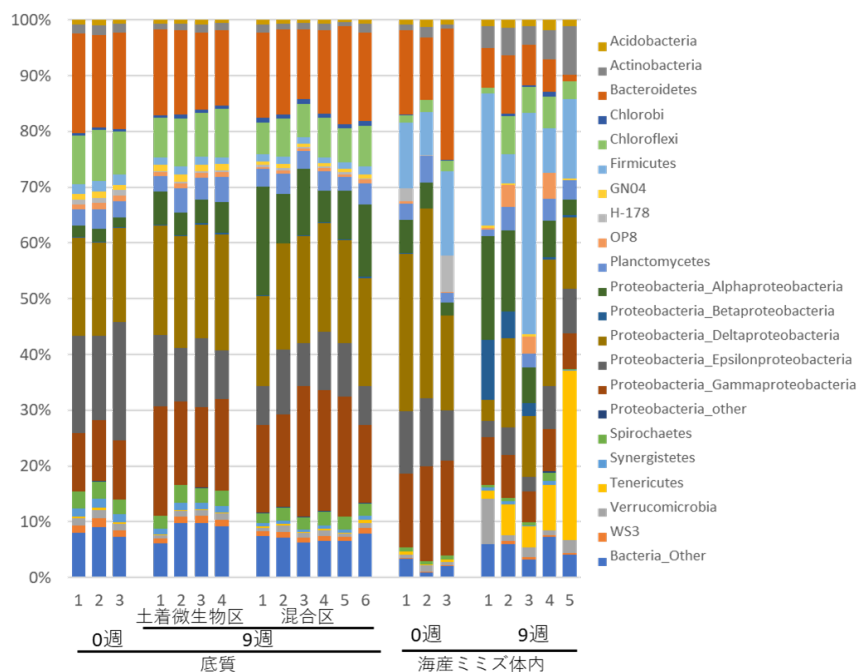


図 2. 底質および海産ミミズ体内の菌叢組成

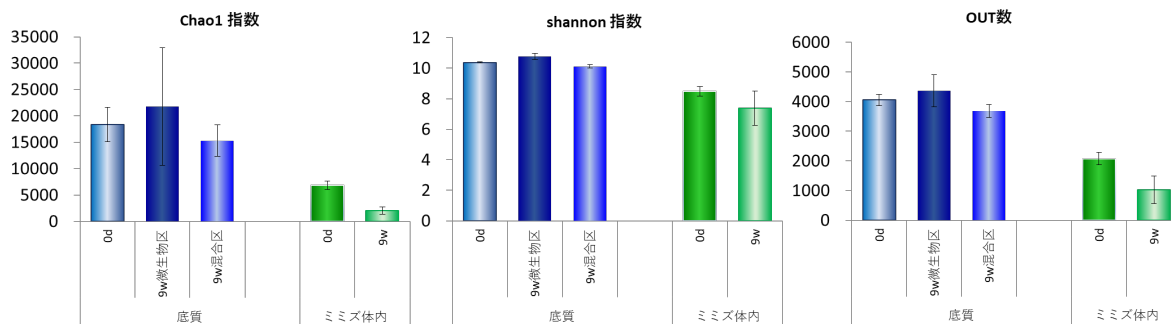


図 3. 混合区と土着微生物区の底質および海産ミミズ体内の細菌叢の多様性比較

(2) 底質浄化の至適温度の特定

15、20 および 25 °C で海産ミミズと土着微生物による汚染底質の浄化試験を実施したところ、いずれの温度においても海産ミミズの生存は維持確認され、特に 20 および 25 °C でバイオマスの増加が確認された。底質中の微生物量は、いずれの温度においても海産ミミズを添加することで減少する傾向が認められた。

間隙水のピレンを含むいくつかの PAHs の溶出量は、海産ミミズ添加群において高い傾向が認められ、その程度は、15 および 25 °C に比べ、20 °C で高かった(図 4)。底生動物による底質浄化の機構の一つとして、底質から水中へ汚染物質を溶出させることで、底質に蓄積した汚染物質を減衰させることが挙げられる。本研究結果で認められた間隙水中の PAHs 濃度の増加は、ミミズの活動が 20 °C において活発になり、底質の攪拌効果などによって底質から海水へ PAHs が溶出したことによると考えられた。また、20 °C では 15 および 25 °C に比べて薬物代謝酵素の発現量が高まることが知られている (Ito et al., 2016)。今回、50 日の浄化期間では底質中の PAHs 濃度は処理区間で差は認められなかったものの、20 °C でより長期間の浄化を実施することで、底質の PAHs 濃度も減衰すると推察された。

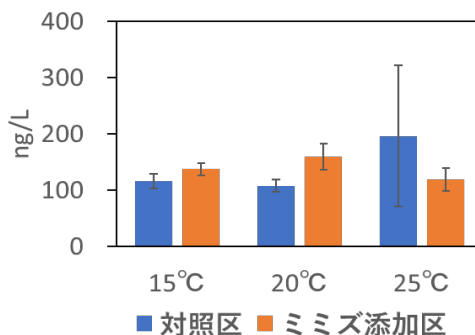


図 4. 試験終了時の間隙水中のピレン(Pyrene)濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. 伊藤 克敏, 伊藤 真奈, 太田 耕平, 羽野 健志, 大久保 信幸, 持田 和彦, 愛媛県福浦湾魚類養殖場下に生息する海産貧毛類ヒメナイワンイトミミズ *Thalassodrilides cf. briani* の季節変動および飼育条件に関する研究, 日本ベントス学会誌, 73, 2018, 57-63, DOI: <https://doi.org/10.5179/benthos.73.57>. (査読有り)
2. 伊藤 克敏, 伊藤 真奈, 羽野 健志, 隠塚 俊満, 持田 和彦, 庄野 暢晃, 中村 龍平, Marine sediment conservation using benthic organisms, 水産研究・教育機構研究報告, 49, 2018, 45-51. (査読有り)
3. Anna Z. Urbisza, Lukasz Chajec, 伊藤 真奈, 伊藤 克敏, The ovary organization in the marine limnodriloidin *Thalassodrilides cf. briani* (Annelida: Clitellata: Naididae) resembles the ovary of freshwater tubificins, Zoology, 128, 2018, 16-26, DOI: [10.1016/j.zool.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.05.004). (査読有り)
4. Mana Ito, Katsutoshi Ito, Kohei Ohta, Takeshi Hano, Toshimitsu Onduka, Kazuhiko Mochida, Transcription of a novel P450 gene varies with some factors (pollutant exposure, temperature, time, and body region) in a marine oligochaete (*Thalassodrilides* sp.), Marine Pollution Bulletin, 109, 2016, 344-349. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2016.05.055](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.055). (査読有り)
5. Mana Ito, Katsutoshi Ito, Kohei Ohta, Takeshi Hano, Toshimitsu, Onduka, Kazuhiko Mochida, Kazunori Fujii, Evaluation of bioremediation potential of three benthic annelids in organically polluted marine sediment, Chemosphere, 163, 2016, 392-399, DOI: [10.1016/j.chemosphere.2016.08.046](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.046). (査読有り)
6. Takaaki Torii, Christer Erseus, Svante Martinsson, Mana Ito, Morphological and Genetic Characterization of the First Species of *Thalassodrilides* (Annelida: Clitellata: Naididae: Limnodriloidinae) from Japan, Species Diversity, 21, 2016, 117-125, DOI: [10.12782/sd.21.2.117](https://doi.org/10.12782/sd.21.2.117). (査読有り)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Mana Ito, Katsutoshi Ito, Takeshi Hano, and Motoharu Uchida, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine sediment by interaction between oligochaete, *Thalassodrilides cf. briani* and microorganisms. The 14th International Symposium on Aquatic Oligochaeta, Sep, 2018, Hirosaki, Japan.
2. 伊藤 真奈, 伊藤 克敏, 羽野 健志, 内田 基晴, 海産ミミズと微生物の協同的な多環芳香族炭化水素(PAHs)の減衰における微生物群集構造解析, 日本微生物生態学会第 32 回大会, 2018 年 7 月, 沖縄
3. Katsutoshi Ito, Mana Ito, Takeshi Hano, Toshimitsu Onduka, Kazuhiko Mochida, Nobuaki Shono and Ryuhei Nakamura, Marine sediment conservation using benthic organisms, 45th Scientific Symposium of the UJNR Aquaculture Panel, 2017, Japan.
4. 伊藤 真奈, 梅澤 明夫, 川市 智史, 庄野 暢晃, 中村 龍平, 伊藤 克敏, 海産ミミズによる海洋底質の環境電位変動に伴う微生物群集構造の解析, 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017 年 8 月
5. Mana Ito, Katsutoshi Ito, Takeshi Hano, Motoharu Uchida, Kazuhiko Mochida, Cooperation of oligochaete, *Thalassodrilides cf. briani* with indigenous microorganisms is an essential factor for degradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediment, XVII ICSZ - International Colloquium on Soil Zoology, Aug, 2016, Nara, Japan.
6. Mana Ito, Katsutoshi Ito, Kazuki Ito, Kohei Ohta, Toshimitsu Onduka, Takeshi Hano, Nobuyuki Ohkubo, Kazuhiko Mochida, Marine oligochaete, *Thalassodrilides* sp.; a potential candidate for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated sediment, 13th International Symposium on Aquatic Oligochaeta - ISAO 2015, Sep, 2015, Brno, Czech Republic.
7. Katsutoshi Ito, Mana Ito, Kohei Ohta, Toshimitsu Onduka, Takeshi Hano, Nobuyuki Ohkubo, Kazuhiko Mochida, Research on the seasonal variation of biomass of marine oligochaete *Thalassodrilides* sp. with high pollution tolerance in Fukuura Bay, Japan and its efficient culture condition. 13th International Symposium on Aquatic Oligochaeta - ISAO 2015, Sep, 2015, Brno, Czech Republic.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：持田和彦

ローマ字氏名：Mochida Kazuhiko

研究協力者氏名：羽野健志

ローマ字氏名：Hano Takeshi

研究協力者氏名：隠塚俊満

ローマ字氏名：Onduka Toshimitsu

研究協力者氏名：伊藤克敏

ローマ字氏名：Ito Katsutoshi

研究協力者氏名：内田基晴

ローマ字氏名：Uchida Motoharu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。